

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R) File 347:JAPIO
(c) 1999 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

04851282

DECOMPOSITION OF ETHYLENE CHLORIDE AND RECOMBINANT PLASMID AND TRANSFORMANT FOR DECOMPOSITION

PUB. NO.: 07-143882 [J P 7143882 A]
PUBLISHED: June 06, 1995 (19950606)
INVENTOR(s): FURUKAWA KENSUKE
NAKAMURA KANJI
APPLICANT(s): KURITA WATER IND LTD [000106] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)
APPL. NO.: 05-292244 [JP 93292244]
FILED: November 22, 1993 (19931122)
INTL CLASS: [6] C12N-015/09; C12N-001/21; C12P-001/00; C12N-015/09; C12R-001/40; C12N-015/09; C12R-001/38; C12N-001/21; C12R-001/19; C12P-001/00; C12R-001/19
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry)

ABSTRACT

PURPOSE: To decompose ethylene chloride at high decomposition rate in high efficiency by using a transformant transformed with a recombination plasmid having high decomposition capacity of ethylene chloride such as trichloroethylene and tetrachloroethylene.

CONSTITUTION: The recombination plasmid to be used in this process contains (A) a hybrid gene containing, as an active site, a gene fragment todClbphA2A3A 4 produced by linking a partial gene todCl of a structural gene coding a toluene- decomposition enzyme originated from Pseudomonas putida F1 to a partial gene bphA2A3A4 of a structural gene coding a biphenyl decomposition enzyme originated from Pseudomonas pseudoalcaligenes, (B) a drug-resistant gene and (C) a gene replicable in a Gramnegative bacteria. The plasmid is introduced into a host bacterium cell and the obtained transformant is used for the decomposition of ethylene chloride.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-143882

(43)公開日 平成7年(1995)6月6日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	7236-4B		
1/21				
C 1 2 P 1/00	A	7417-4B		
		9050-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-292244

(22)出願日 平成5年(1993)11月22日

(71)出願人 000001063

栗田工業株式会社

東京都新宿区西新宿3丁目4番7号

(72)発明者 古川 謙介

福岡県宗像市大谷36番地11

(72)発明者 中村 寛治

東京都新宿区西新宿3丁目4番7号 栗田
工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 柳原 成

(54)【発明の名称】 塩化エチレンの分解方法、分解用組換プラスミドおよび形質転換体

(57)【要約】

【目的】 トリクロロエチレンおよびテトラクロロエチレン等の塩化エチレンに対する分解能の高い組換プラスミドを導入した形質転換体により、塩化エチレンを速い分解速度で効率よく分解する。

【構成】 シュードモナス プチダ F1由来のトルエン分解酵素をコードする構造遺伝子の部分遺伝子 t o d C 1 と、シュードモナス シュードアルカリゲネス由来のピフェニル分解酵素をコードする構造遺伝子の部分遺伝子 b p h A 2 A 3 A 4 とを結合した遺伝子断片 t o d C 1 b p h A 2 A 3 A 4 を活性部位として含むハイブリッド遺伝子、薬剤耐性遺伝子、およびグラム陰性細菌内で複製可能な遺伝子を含む組換プラスミドを、宿主細菌に導入し、得られた形質転換体を用いて塩化エチレンを分解する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードモナス プチダ F1 (*Pseudomonas putida* F1) 由来のトルエン分解酵素をコードする構造遺伝子の部分遺伝子 todC1 と、シュードモナス シュードアルカリゲネス (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) 由来のビフェニル分解酵素をコードする構造遺伝子の部分遺伝子 bphA2A3A4 とを結合した遺伝子断片 todC1bphA2A3A4 を活性部位として含むハイブリッド遺伝子、

薬剤耐性遺伝子、およびグラム陰性細菌内で複製可能な遺伝子を含み、グラム陰性細菌内で複製可能な塩化エチレン分解用組換プラスミド。

【請求項2】 請求項1記載の組換プラスミドを宿主細菌に導入したことを特徴とする塩化エチレン分解用形質転換体。

【請求項3】 請求項2記載の形質転換体を用いて塩化エチレンを分解することを特徴とする塩化エチレンの分解方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は宿主細胞にトリクロロエチレン、テトラクロロエチレン等の塩化エチレンに対する分解能を付与することができる塩化エチレン分解用組換プラスミド、この組換プラスミドを保持する塩化エチレン分解用形質転換体およびこの形質転換体を用いた塩化エチレンの分解方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン等の塩化エチレンは溶剤などとして広く使用されているが、有毒であり、自然の微生物によって容易に分解されないため、各地で土壌、地下水汚染を引起している。

【0003】 塩化エチレンの処理方法としては活性炭等に吸着させて除去する方法があるが、この方法はただ塩化エチレンを回収するだけで、無毒化することはできず、本質的な解決にはなっていない。また嫌気的な処理によりトリクロロエチレンやテトラクロロエチレンを分解することもできるが、毒性の高いジクロロエチレンやビニルクロリド等の中間生成物が生成されるという問題点がある。

【0004】 このような問題点の解決に、塩化エチレンを分解する酵素または微生物の利用が有効な対策となり得る。従来、トリクロロエチレンを分解する酵素としては、メタン酸化細菌のもつメタンモノオキシゲナーゼ、トルエン酸化細菌のもつトルエンモノオキシゲナーゼ、トルエンジオキシゲナーゼ、硝化細菌のもつアンモニアモノオキシゲナーゼが知られている。しかし、上記のようなトリクロロエチレン分解能を有する自然菌のトリクロロエチレン分解能は低く、効率よくトリクロロエチ

レンを分解することができないという問題点がある。

【0005】 一方特表平2-503866号には、シュードモナス メンドシナ KR-1 (*Pseudomonas mendocina* KR-1) 由来のトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子 (トルエンオキシゲナーゼはトリクロロエチレンを分解する) を宿主細菌に導入し、この形質転換体を用いてトリクロロエチレンを分解する方法が記載されている。しかし、この方法は、トルエンモノオキシゲナーゼを単独で利用しているため、トリクロロエチレン分解能が低い。

【0006】 また *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 15, No. 12, 1989, p. 3162-3166 (以下、文献1という) には、シュードモナス プチダ F1 由来のトルエンジオキシゲナーゼ遺伝子 (todC1C2BA) を大腸菌に導入し、この形質転換体を用いてトリクロロエチレンを分解する方法が記載されている。しかし、この形質転換体のトリクロロエチレン分解能も低く、効率よくトリクロロエチレンを分解することはできない。

【0007】 また *Journal of Bacteriology*, Vol. 175, No. 16, 1993, p. 5224-5232 (以下、文献2という) には、シュードモナス プチダ F1 由来のトルエンジオキシゲナーゼの遺伝子の一部 (todC1) と、シュードモナス シュードアルカリゲネス KF707 由来のビフェニル分解能を有する遺伝子の一部 (bphA2A3A4BC) とを含むハイブリッド遺伝子 (todC1(F1)bphA2A3A4BC (KF707)) を含有するプラスミド pJHF10 が記載され、このハイブリッド遺伝子 todC1bphA2A3A4BC はトルエン分解能を有することが開示されている。しかし、この文献2にはプラスミド pJHF10 が宿主細菌に塩化エチレン分解能を付与することは記載されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、塩化エチレン分解能の高い塩化エチレン分解用組換プラスミドを提供することである。本発明の別の目的は、上記組換プラスミドを宿主細菌に導入した塩化エチレン分解用形質転換体を提供することである。本発明の他の目的は、上記形質転換体を用いた塩化エチレンの効率のよい分解方法を提案することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明は次の塩化エチレン分解用組換プラスミド、形質転換体、およびそれを用いた塩化エチレンの分解方法である。

(1) シュードモナス プチダ F1 (*Pseudomonas putida* F1) 由来のトルエン分解酵素をコードする構造遺伝子の部分遺伝子 todC1 と、シュードモナス シュードアルカリゲネス (*Pseud*

omonaspseudocaligenes) 由来のビフェニル分解酵素をコードする構造遺伝子の部分遺伝子 bphA2A3A4 とを結合した遺伝子断片 todC1bphA2A3A4 を活性部位として含むハイブリッド遺伝子、薬剤耐性遺伝子、およびグラム陰性細菌内で複製可能な遺伝子を含み、グラム陰性細菌内で複製可能な塩化エチレン分解用組換えプラスミド。

(2) 上記(1)記載の組換えプラスミドを宿主細菌に導入したことを特徴とする塩化エチレン分解用形質転換体。

(3) 上記(2)記載の形質転換体を用いて塩化エチレンを分解することを特徴とする塩化エチレンの分解方法。

【0010】本発明において分解の対象となる塩化エチレンには、モノ、ジ、トリおよび/またはテトラクロロエチレンが含まれるが、特にトリクロロエチレンおよび/またはテトラクロロエチレンが分解の対象として適している。

【0011】本発明で使用するハイブリッド遺伝子は、遺伝子断片 todC1bphA2A3A4 を少なくとも含む遺伝子であり、todC1bphA2A3A4 のほか、これに bphB または C が結合した todC1bphA2A3A4B または todC1bphA2A3A4BC で示されるものなども含まれる。todC1 部分はシュードモナス プチダ F1 由来のトルエン分解酵素をコードする構造遺伝子（以下、トルエン分解遺伝子という）todC1C2BA の todC1 部分である。また bphA2A3A4、bphA2A3A4B または bphA2A3A4BC 部分はシュードモナス シュードアルカリゲネス由来のビフェニル分解酵素をコードする*30

*構造遺伝子（以下、ビフェニル分解遺伝子という）bphA1A2A3A4BC の部分または全体である。

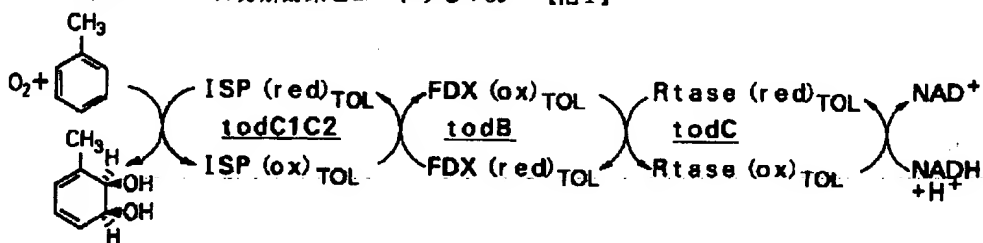
【0012】トルエン分解遺伝子 todC1C2BA の供給源としては、米国アイオワ大学のディビッド ティー ギブソンらが自然界より分離したシュードモナス プチダ F1 をあげることができる。この他にもシュードモナス プチダ F1 由来のトルエン分解遺伝子が組込まれた菌株を todC1C2BA の供給源にすることができる。

10 【0013】このような菌株としては、例えば工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-13966 として寄託されているエセリシア コリ KWI-10 (*Escherichia coli* KWI-10) などがあげられる。この菌株は、ベクタープラスミド pUC119 (ATCC No. 37461, ATCC Catalogue of Recombinant DNA Materials 2nd edition, 1991) に todC1C2BA 遺伝子が組込まれたプラスミド pJHF3051 を保有しているので、このプラスミド pJHF3051 を供給源にすることもできる。これらの菌株から遺伝子 todC1C2BA を得るには、制限酵素により切出すことができる。

【0014】遺伝子 todC1C2BA は、トルエンを *cis*-トルエンジヒドロジオールに酸化するトルエンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子であると認められる。トルエンの *cis*-トルエンジヒドロジオールへの分解過程に関与するタンパク質と遺伝子群 todC1C2BA との関係を下記反応式〔1〕に示す。

【0015】

〔化1〕



.....〔1〕

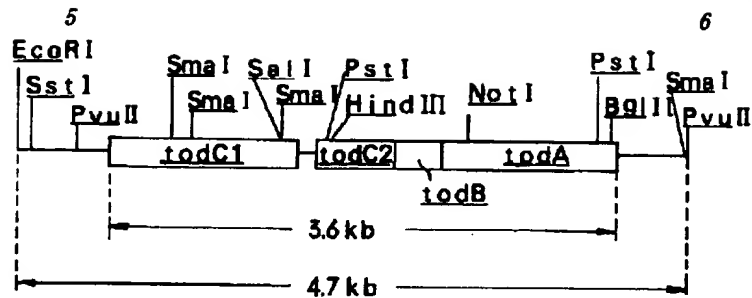
〔反応式中、ISPは鉄-硫黄タンパク質 (iron-sulfur protein)、FDXはフェレドキシン (ferredoxin)、Rtaseはリダクターゼ (reductase)、redは還元体、oxは酸化体、TOLはトルエンを示す。〕

【0016】上記反応式〔1〕に示されているように、NADHからの電子伝達系はリダクターゼ、フェレドキシンおよび鉄-硫黄タンパク質の3種類のタンパク質

（トルエンジオキシゲナーゼを構成する構成成分）から構成され、これらはそれぞれ遺伝子 todC1C2、遺伝子 todB および遺伝子 todA によりコードされている。

【0017】シュードモナス プチダ F1 由来の todC1C2BA 遺伝子の制限酵素地図を下記に示す。

〔化2〕



... (2)

todC1C2BAについては、前記文献1およびThe Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, No. 25, 1989, p. 14940-14946などに詳述されている。

【0018】todC1C2BA遺伝子を構成している部分遺伝子todC1を得るには、前記供給源から制限酵素により切出すことができるほか、プラスミドpJHF3051をテンプレートDNAとしてポリマーチェーンリアクション（PCR）により化学的に合成することもできる。

【0019】ビフェニル分解遺伝子bphA1A2A3A4BCの供給源としては、発明者の古川が自然界より分離し、生命工学工業技術研究所にFERM P-8297として寄託されているシュードモナス シュードアルカリゲネス KF707 (Pseudomonas pseudoalcaligenes KF707)を例示できる。

【0020】なお、本菌株の菌学的性質は以下のとおりである。

〔菌学的性質〕

グラム；陰性

桿菌；0.7×1.5~2.0μm

極鞭毛；1本

41℃での生育；陽性

最適生育温度；35℃

資化性；グルコース、コハク酸、乳酸、ビルビン酸 *

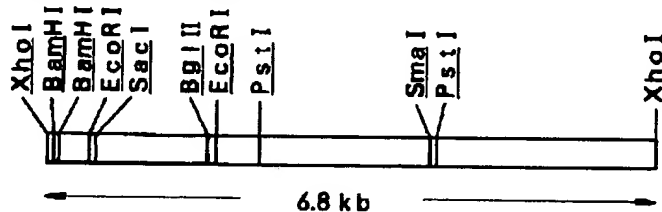
*以上の菌学的性質からバージーズ、マニュアル オブ システイマテイクオブ バクテリオロジー第9版に基づき探索した結果、シュードモナス シュードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcaligenes) と認められる。なお、この菌株および遺伝子**bphA1A2A3A4BC**の詳細などについては、特開昭61-282085号ほかに記載されている。

20 【0021】シュードモナス シュードアルカリゲネス KF707と同一の菌株が生命工学工業技術研究所に寄託され、FERM P-13965として受託されている。なお、便宜上この菌株をシュードモナス シュードアルカリゲネス KWI-11 (Pseudomonas pseudoalcaligenes KWI-11)と呼ぶ。

【0022】この菌株からの遺伝子**bphA1A2A3A4BC**の切出しは、前記菌株を、例えばL培地（バクトリプトン10g、イーストエキス5g、食塩5g、蒸留水1 liter）に一晩増殖させ、リゾチーム-S DS法により溶菌した染色体DNAを調製し、次いで染色体DNA（1μg）を制限酵素XhoIで切断することにより行うことができる。

【0023】このような方法により切出した**ビフェニル分解遺伝子の制限酵素地図**を下記に示す。下記に示される制限酵素地図内に、遺伝子**bphA1A2A3A4BC**が含有されている。

〔化3〕



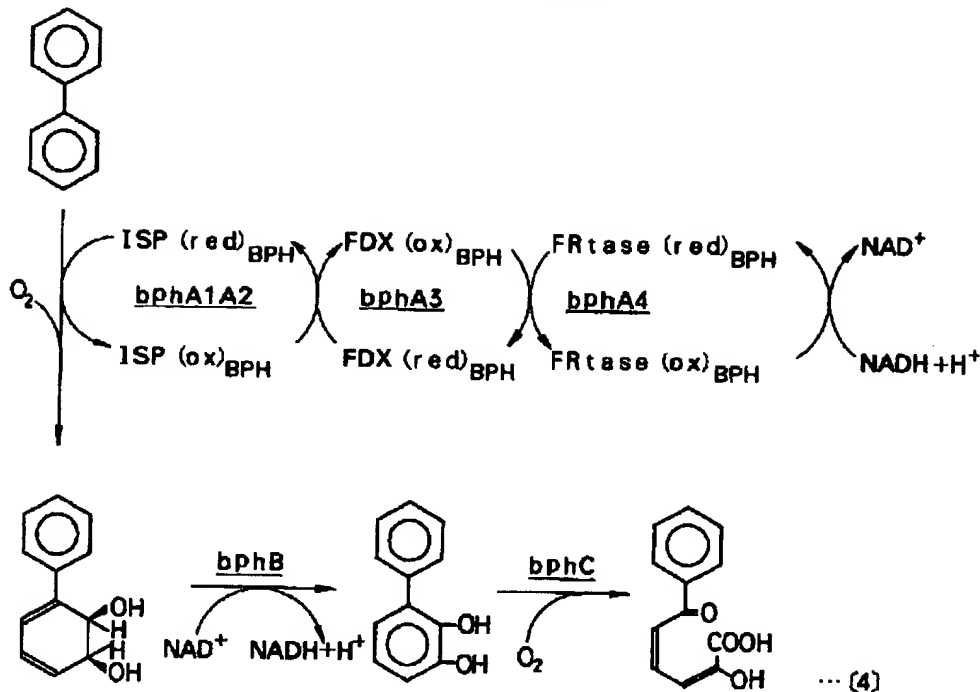
... (3)

【0024】遺伝子**bphA1A2A3A4**は**ビフェニル**をジヒドロジオールに酸化する**ビフェニルジオキシゲナーゼ**をコードする遺伝子であると認められる。ビフェ

ニルの分解過程に関与するタンパク質と遺伝子群**bphA1A2A3A4BC**との関係を下記反応式〔4〕に示す。

[0025]

* [化4]



〔反応式中、ISPは鉄-硫黄タンパク質 (iron-sulfur protein)、FDXはフェレドキシン (ferredoxin)、FRtaseはフェレドキシン リダクターゼ (ferredoxin reductase)、redは還元体、oxは酸化体、BPHはビフェニルを示す。〕

〔0026〕上記反応式〔4〕に示されているように、ビフェニル分解の第1段目の反応におけるNADHからの電子伝達系はフェレドキシン リダクターゼ、フェレドキシンおよび鉄-硫黄タンパク質の3種類のタンパク質 (ビフェニルジオキシゲナーゼを構成する構成成分) から構成され、それぞれ遺伝子bphA4、遺伝子bphA3および遺伝子bphA1A2によりコードされている。また第2段目の反応を触媒する酵素は遺伝子bphB、第3段目の反応を触媒する酵素は遺伝子bphCによりコードされている。これらの遺伝子はオペロンを形成している。

〔0027〕ハイブリッド遺伝子は、前記トルエン分解遺伝子の部分遺伝子todC1と、前記ビフェニル分解遺伝子の部分遺伝子bphA2A3A4とを結合した遺伝子断片todC1bphA2A3A4を、少なくとも塩化エチレン分解能が発現する活性部位として含有するものであり、さらに他の遺伝子断片bphBまたはbphCが付加していてもよい。このようなハイブリッド遺伝子としては、例えばtodC1bphA2A3A4、todC1bphA2A3A4BCなどがあげられるが、これらに限定されない。

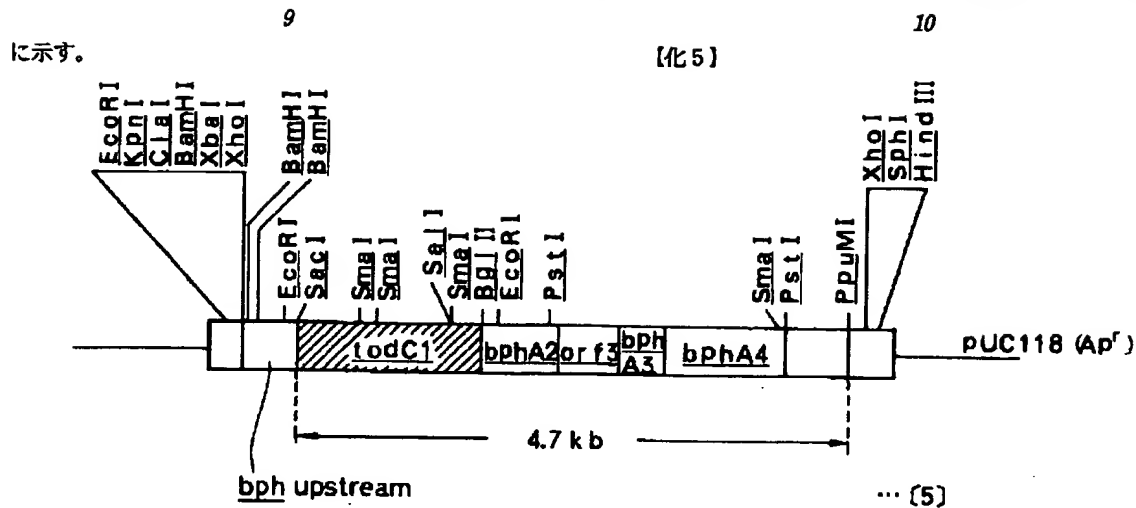
〔0028〕上記のハイブリッド遺伝子は、例えば次の

ようにして得ることができる。制限酵素XhoI切断部位を有するプラスミドpHSG396 (宝酒造 (株) 製) をXhoIで切断し、これに前記制限酵素地図〔3〕で示されるDNA断片 (bphA1A2A3A4BCを含んでいる) をT₄リガーゼで結合し、組換えプラスミドpKTF10を構築する。次にpUC118からSacIサイトを除去したプラスミドpUC118ΔSacIを得る。このpUC118ΔSacIをXbaIとHindIIIで切断し、上記pKTF10からXbaIとHindIIIで切出したbphA1A2A3A4BCを含むDNA断片をライゲーションさせpJHF18を構築する。

〔0029〕一方、前記プラスミドpJHF3051 (todC1C2BAを含んでいる) をテンプレートDNAとし、ポリマーチェーンリアクションにより5'-末端側にSacI切断部位および3'-末端側にBglII切断部位を有するtodC1断片を合成する。

〔0030〕前記pJHF18をSacIとBglIIで切断してbphA1を除去し、これをSacIとBglIIで切断したtodC1断片とライゲーションすることにより、ハイブリッド遺伝子todC1bphA2A3A4BCを有するプラスミドpJHF10が得られる。さらにこのプラスミドをPpuMIで切断してbphBを除去することにより、ハイブリッド遺伝子todC1bphA2A3A4を有するプラスミドpJHF101が得られる。

〔0031〕このようにして得られるハイブリッド遺伝子todC1bphA2A3A4の制限酵素地図を下記



〔地図中、orf3はオープンリーディングフレーム3 (open reading frame 3)、Ap^rはアンピシリン耐性遺伝子を示す。〕

【0032】本発明の塩化エチレン分解用組換プラスミドは、上記により結合された遺伝子断片である todC1bphA2A3A4 を活性部位として含むハイブリッド遺伝子を有している。 todC1bphA2A3A4 から形成されるタンパク質はピフェニルジオキシダーゼの遺伝子 bphA1 から形成される鉄-硫黄タンパク質のサブユニット (ISPサブユニット) が遺伝子 todC1 から形成されるISPサブユニットで置換された酵素である。このタンパク質 (酵素) は高い塩化エチレン分解能、特にトリクロロエチレンまたはテトラクロロエチレンに対する高い分解能を有しているので、本発明の組換プラスミドを宿主細菌に導入し、得られた形質転換体を用いて塩化エチレン、特にトリクロロエチレンまたはテトラクロロエチレンを効率よく分解することができる。

【0033】本発明の組換プラスミドは、次のDNA断片をリガーゼで連結して構築することができる。

- 1) 前記遺伝子断片 todC1bphA2A3A4 を活性部位として含むハイブリッド遺伝子
- 2) 薬剤耐性遺伝子 (マーカー)
- 3) グラム陰性細菌内で複製可能な遺伝子

【0034】薬剤耐性遺伝子としては、アンピシリン耐性遺伝子 (Am^r)、クロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などが採用できる。これらの薬剤耐性遺伝子は、pKT240 (ATCC No. 37258)、pUC118 (ATCC No. 37462、いずれもこれらのカタログ番号でATCCから市販されている)、pACYC184、pKK223-3、pTrc99Aなどのプラスミドから分離できる。

【0035】グラム陰性細菌内で複製可能な遺伝子としては、グラム陰性細菌内における自律的複製に必要な遺伝子および複製開始部位を含む広宿主複製領域などが

使用できる。広宿主複製領域は、組換プラスミドがグラム陰性細菌内で独立して増殖し、安定して保持されるのに必要な遺伝子領域であり、プラスミドpUC118またはプラスミドRSF1010由来のもの等を採用することができるが、これら限定されない。RSF1010はグラム陰性細菌内における自律的複製に必要な遺伝子および複製開始部位を含み、約5.8 kbのDNA領域に集中して存在する。この領域はRSF1010だけでなく、pKT240、pMMB22等のプラスミドから制限酵素等の核酸分解酵素を用いて分離することができる。

【0036】本発明の組換プラスミドは、lacプロモーターなどのプロモーターにより塩化エチレン分解能を発現させるのが好ましい。組換プラスミドの宿主細菌への導入は、エレクトロポレーション法、カルシウムおよびリビジウム処理による方法、ヘルパープラスミドを用いた伝達による方法、Hanahanの方法 ("Molecular Cloning" の第2版, Cold Spring Harbor Lab. 出版) 等の常法によって、極めて容易に行うことが可能である。宿主細菌としては、組換プラスミドが安定に維持される大腸菌などのグラム陰性細菌が利用される。

【0037】本発明の塩化エチレン分解用形質転換体は、上記の組換プラスミドを導入した形質転換体であり、この形質転換体を用いて塩化エチレン、特にトリクロロエチレンまたはテトラクロロエチレンを効率よく分解することができる。塩化エチレンの分解は、塩化エチレンを含む培地中で形質転換体を好氣的に培養する等の方法により行うことができ、完全に脱ハロゲン化できる。

【0038】塩化エチレン分解用形質転換体の培養は、宿主細菌の生育に適した条件で行われるが、炭素源および窒素源としてペプトン、トリプトン、酵母エキス等、無機塩として塩化ナトリウム、塩化カリウム等を用い、培地のpH 5~8.5、好ましくは6~7、温度15~40℃、好ましくは35℃前後で好氣的に培養するのが

望ましい。

【0039】

【実施例】次に本発明の実施例について説明する。実施例で使用したプラスミドおよび微生物は次の通りである。

1) pUC118

グラム陰性細菌内で複製可能であり、アンピシリン耐性遺伝子、lacプロモーターおよびマルチクローニングサイトを有している。サイズは3.2 kb、ATCC No. 37462のカタログ番号でATCC (American Type Culture Collection) から市販されている。

【0040】2) pJHF3051

シュードモナス プチダ F1由来のトルエン分解遺伝子 todC1C2BA が pUC119 (ATCC No. 37461) に組込まれた6.5 kbpのプラスミド。このプラスミドはエセリシア コリ KWI-10 に導入されている。

【0041】3) pHSG396

クロラムフェニコール耐性遺伝子を有するpUCタイプのクローニングベクタープラスミドである。ピフェニル分解遺伝子の切出し制限酵素である XhoI のクローニングサイトを有している。宝酒造 (株) からNo. 3396のカタログ番号 (Bio Technology catalog 1993) で市販されている。

【0042】4) エセリシア コリ KWI-10

トルエン分解遺伝子 todC1C2BA が組込まれたプラスミド pJHF3051 を、エセリシア コリ JM109 に導入した組換え菌で、前記微生物の受託番号で寄託されている。

【0043】5) シュードモナス シュードアルカリゲネス KWI-11

ピフェニル分解遺伝子 bphA1A2A3A4BC を染色体DNAとして保持する菌株で、前記微生物の受託番号で寄託されている。

6) エセリシア コリ JM109

ATCC No. 53323 (前述のカタログ) のカタログ番号でATCCから市販されている。

【0044】実施例1

図1～図3に示す手順で塩化エチレン分解用組換えプラスミド pJHF101 を構築した。まず、図1に示すようにシュードモナス シュードアルカリゲネス KWI-11 の染色体を制限酵素 XhoI で切断し、このDNA断片を、XhoI で切断したプラスミド pHSG396 に組み込み、エセリシア コリ JM109 に導入して形質転換体を得た。この形質転換体に2, 3-ジヒドロキシピフェニルをスプレーし、黄変した菌株を培養した。この菌株中には、遺伝子 bphA1A2A3A4BC を含む前記制限酵素地図〔3〕で示されるDNA断片が pHSG396 に組込まれたプラスミド pKTF10 が保

持されている。

【0045】上記組換えプラスミド pKTF10 を XbaI と HindIII で切断し、bphA1A2A3A4BC を含む XbaI～HindIII の断片を切出した。次に pUC118 を SacI で切断し、これをT₄ポリメラーゼで処理し、平滑末端にしたものをセルフライゲーションさせ、SacI サイトを削除したプラスミド pUC118ΔSacI を作成した。この pUC118ΔSacI のマルチクローニングサイトを XbaI と HindIII で切断し、上記 bphA1A2A3A4BC を含む XbaI～HindIII の断片をライゲーションさせ、プラスミド pJHF18 を作成した。

【0046】一方図2に示すように、エセリシア コリ KWI-10 に保持されている pJHF3051 (このプラスミド中には todC1C2BA 遺伝子が組込まれている) をテンプレートDNAとし、5'-TCTCTCGAGCTCGAAAGTGAGAAGACAATGA-3' (下線は SacI 切断部位を示す) および 3'-CTTCCGCTGTCCGACTAGTCTAGAACGAA-5' (下線は BglII 切断部位を示す) の2つのプライマーを用いて、GeneAmp PCR Kit (宝酒造 (株) 製、商品名) により、一方の末端に SacI、他方の末端に BglII の切断部位を有する遺伝子 todC1 をPCR (ポリマー チェーン リアクション) によって合成した。この時のDNAの増幅回数は20回で、条件は、DNAの変性が95℃で30秒、プライマーのアニーリングが55℃で30秒、プライマーの伸長が72℃で1分とした。

【0047】上記により得られた todC1 を含むPCR生成物を、SacI と BglII で切断した。一方、pJHF18 を SacI と BglII で切断して bphA1 を取除いた後、上記 SacI～BglII 断片をライゲーションさせてプラスミド pJHF10 を作成した。この操作により、pJHF18 の bphA1 が todC1 に置換される。このプラスミドは、bphC1bphA2A3A4BC のハイブリッド遺伝子断片を含んでいる。

【0048】次に図3に示すように、上記で得られた pJHF10 を PvuMI で切断し、切出された bphBC を含む断片を除去し、セルフライゲーションにより pJHF101 を作成した。このプラスミドは todC1bphA1A2A3A4 のハイブリッド遺伝子断片を含んでいる。

【0049】実施例2

エセリシア コリ JM109 に Hanahan の方法により、実施例1で得たプラスミド pJHF10 または pJHF101 を導入し、形質転換体を得た。この大腸菌をエセリシア コリ JM109 (pJHF10) またはエセリシア コリ JM109 (pJHF101) と呼ぶ。

【0050】これらの形質転換体を用いて、トリクロロエチレンの分解試験を次のようにして行った。エセリシ

ア コリ JM109 (pJHF10) またはエセリシア コリ JM109 (pJHF101) をLB培地で37℃にて培養し、600nmでの吸光度(以下A₆₀₀という)が1.0~2.0に達した時点で遠心分離により集菌し、菌体を下記無機培地にA₆₀₀が2.0になるように懸濁した。

【0051】無機培地:

Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄ (1M, pH6.8)	40ml
Hunter's vitamin-free mineral base #1	20ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
蒸留水	840ml

#1 Hunter's vitamin-free mineral base:

ニトリロ三酢酸	10.0 g
MgSO ₄	14.45 g
CaCl ₂ ・2H ₂ O	3.335g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ・4H ₂ O	9.25 mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	99 mg
メタルズ "44" #2	50 ml

蒸留水 全量で1000mlとする

#2 メタルズ "44" (Metals "44"):

エチレンジアミン四酢酸	250.0mg
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	1095.0mg (250mg Zn)
FeSO ₄ ・7H ₂ O	500.0mg (100mg Fe)
MnSO ₄ ・H ₂ O	154.0mg (50mg Mn)
CuSO ₄ ・5H ₂ O	39.2mg (10mg Cu)
Co(NO ₃) ₂ ・6H ₂ O	24.8mg (5mg Co)
Na ₂ B ₄ O ₇ ・10H ₂ O	17.7mg (2mg B)

数滴の硫酸を加えて沈殿を防止する

蒸留水 100ml

【0052】この菌溶液10mlをジーエルサイエンス社製の125ml容のバイアルビンに入れ、トリクロロエチレン10mg/l (すべて液に溶解した場合の濃度)を添加し、テフロンコートブチルゴム栓をした後、アルミキャップでシールした。このバイアルビン30*

配列

TCTCTCGAGC TCGAAAAGTG AGAAGACAAT GA

32

【0059】配列番号:2

配列の長さ:30

配列の型:核酸

配列

AAGCAAGATC TGATTCAGCG TGTGCGCTTC

30

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1におけるプラスミドpJHF101の構築のステップを示す概略図である。

【図2】実施例1におけるプラスミドpJHF101の

*℃、200rpmで振とう培養し、定期的に気相をガスタイトシリンジで100μlサンプリングし、トリクロロエチレンの分解試験を行った。対照としては、エセリシア コリ KWI-10 (エセリシア コリJM109にプラスミドpJHF3051を導入した組換え菌)を用いた。結果を図4に示す。

【0053】図4の結果から、実施例の形質転換体はいずれも対照のものに比べて約3倍の分解速度でトリクロロエチレンを分解しており、ハイブリッド遺伝子がトリクロロエチレンの分解に非常に有効であることがわかる。

【0054】

【発明の効果】本発明の塩化エチレン分解用組換えプラスミドは、シュードモナス プチダ F1由来のtodC1遺伝子とシュードモナス シュードアルカリゲネス由来のbphA2A3A4遺伝子とを結合した遺伝子断片todC1bphA2A3A4を、塩化エチレン分解能が発現する活性部位として含有しているので、塩化エチレン分解能の高い酵素を生成させることができる。

【0055】本発明の塩化エチレン分解用形質転換体は、上記組換えプラスミドにより形質転換されているので、塩化エチレン分解能が高い。

【0056】本発明の塩化エチレンの分解方法は、上記形質転換体を用いているので、塩化エチレンを簡単に速い分解速度で効率よく分解することができる。

【0057】

【配列表】

【0058】配列番号:1

配列の長さ:32

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

※鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

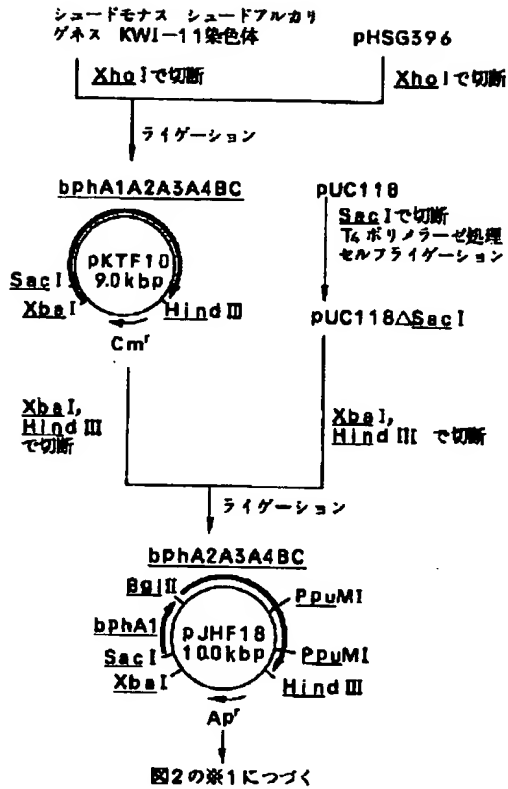
※ 配列の種類:他の核酸 合成DNA

構築のステップを示す概略図である。

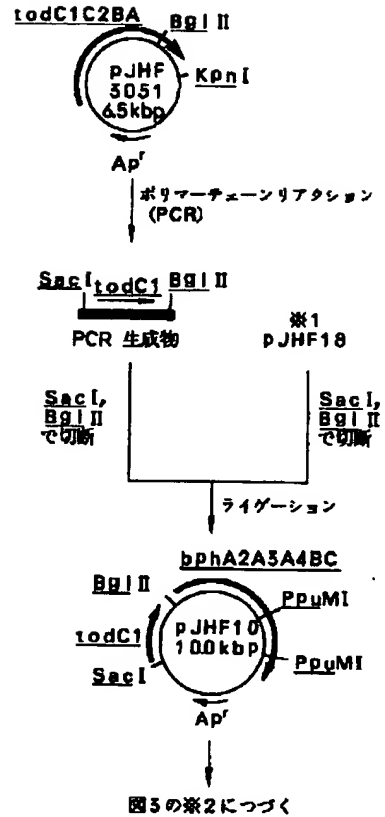
【図3】実施例1におけるプラスミドpJHF101の構築のステップを示す概略図である。

【図4】実施例2の結果を示すグラフである。

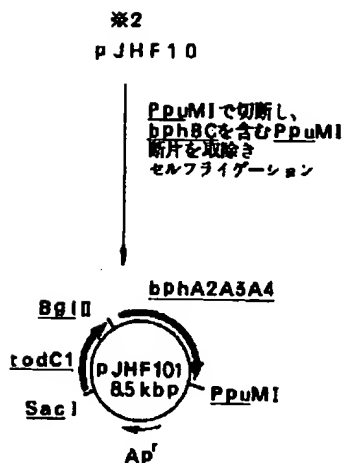
【図1】



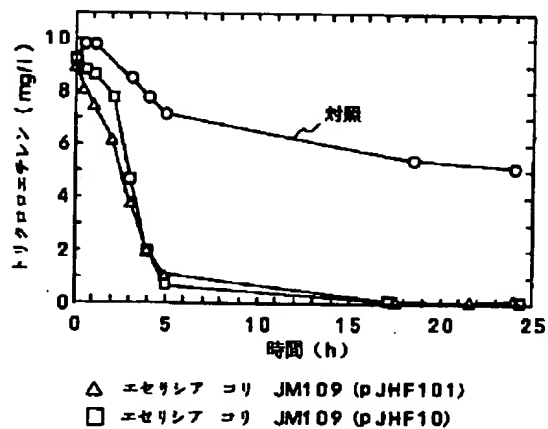
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

//C12N 15/09

ZNA

C12R 1:40

(10)

特開平7-143882

(C12N 15/09 ZNA
C12R 1:38)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12P 1/00
C12R 1:19)

C12R 1:40)
(C12N 15/00 ZNA A
C12R 1:38)